FARA AMELIA PRIMELLES EGUIA

**Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação do
Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante
produzido em *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia da
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e
Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção
do Título de Doutor em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia
Orientador: Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves
Coorientador: Dr. Enéas de Carvalho

São Paulo
2018

RESUMO

Eguia, FAP. **Desenvolvimento de uma tecnologia para produção e purificação do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito humano recombinante produzido em *Escherichia coli***. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Os neutrófilos são glóbulos brancos do sangue e primeira linha de defesa contra as bactérias. A proliferação destas células é principalmente controlada pelo Fator Estimulador de Colônia de Granulócito (G-CSF). O G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) é um medicamento amplamente utilizado para tratar a neutropenia, condição caracterizada pela contagem de neutrófilos abaixo de $1.500/\text{mm}^3$. O rhG-CSF já foi obtido no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan em *E. coli* como corpos de inclusão (CI), reportando-se instabilidade do plasmídeo e baixo rendimento. Neste trabalho, o plasmídeo pARKAN-I foi avaliado para produzir rhG-CSF em *E. coli* e viabilizar sua obtenção em biorreator. Esse vetor carrega a sequência pAR, inserida para aumentar sua estabilidade. *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS transformada com pARKAN-I/rhG-CSF foi cultivada em frascos agitados para avaliação da estabilidade do plasmídeo em meios complexos (2YT e de autoindução) e quimicamente definido (HDF). Avaliou-se a influência de indutores (IPTG e lactose), glicose e antibióticos sobre a estabilidade plasmidial. A fim de se obter material para purificação, foram realizados cultivos em biorreator com meio de autoindução sem antibióticos em modo batelada e HDF com antibióticos em modo batelada alimentada, a 30°C, 30% de oxigênio e pH 6,8. As etapas de purificação incluíram: lise em homogeneizador contínuo de alta pressão, lavagens, solubilização e renaturação dos CI, e cromatografia de troca catiônica em SP-Sepharose. Avaliaram-se três métodos de renaturação: diafiltração, diálise e diluição. A estabilidade do plasmídeo foi avaliada pela percentagem de colônias obtidas em placas de LB-ágar com antibiótico em relação às colônias que cresceram nas placas de LB-ágar sem antibiótico. A identidade proteica foi determinada por SDS-PAGE e Western Blotting. A pureza relativa e a produção específica do rhG-CSF foram determinadas por densitometria das bandas da eletroforese. A quantificação proteica foi feita pelo método do ácido bicinonínico. Nos cultivos em frascos com meio 2YT sem glicose, o crescimento foi mais lento, porém a fase exponencial mais prolongada, alcançando concentração celular (Cx) mais elevada (2,56 g/L) do que as culturas com glicose ($Cx \approx 1,35$ g/L), que cresceram mais rápido e chegaram primeiro à fase estacionária. O cultivo com meio de autoindução proporcionou crescimento similar ao do meio 2YT sem glicose. Em meio HDF, os cultivos tiveram o crescimento mais lento e menor Cx (0,94 g/L). Os meios 2YT e de autoindução mostraram 100% de colônias resistentes à canamicina antes e após indução, exceto o 2YT sem antibiótico e sem glicose, com 97,5% e 94,1% após 6 e 8 h de indução, respectivamente, coincidindo com a maior produção de rhG-CSF. Em frascos, o meio HDF com antibiótico teve 93% de colônias resistentes antes da indução dos cultivos em frascos, diminuindo até 85% após 4 h de indução, com baixa produção do rhG-CSF, verificada apenas por Western Blotting. Os cultivos em biorreator mostraram baixa velocidade específica de crescimento ($0,30 \text{ h}^{-1}$), porém elevada Cx e produção de rhG-CSF, sendo superior no meio de autoindução, que também resultou mais barato do que o HDF. O método de diluição em tampão tris 20 mM pH 8,0 com EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1% e glicerol 10% apresentou maior percentagem de renaturação. Foi estabelecido um processo de purificação que permitiu obter rhG-CSF com 87% de pureza, integridade estrutural e atividade biológica. O plasmídeo pARKAN-I, vetor sem restrições de propriedade intelectual e proteção de patente, mostrou alta estabilidade nos meios complexos avaliados, tanto em frasco como em biorreator, permitindo produzir rhG-CSF em larga escala sem adição de antibióticos ao meio de cultura, o que reduziu o custo do processo de obtenção.

Palavras chaves: rhG-CSF, estabilidade plasmidial, meio de autoindução, cultivo em biorreator, renaturação, purificação

ABSTRACT

Eguia, FAP. **Development of a technology to produce and purify the recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *Escherichia coli***. 2018. 125 f. Thesis (Ph. D. Thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018

Neutrophils are white blood cells and part of the first line of defense against bacteria. The proliferation of these cells is mainly controlled by the Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF). Recombinant human G-CSF (rhG-CSF) is widely used to treat neutropenia, condition characterized by a neutrophil count below $1,500/\text{mm}^3$. The rhG-CSF was already obtained at the Biotechnology Center of the Butantan Institute in *E. coli* as inclusion bodies (IB), but plasmid instability and low yield were reported. In this work, the plasmid pARKAN-I was evaluated to produce rhG-CSF in *E. coli* and enable the bioreactor production. This vector carries a pAR sequence, inserted to increase its stability. *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS transformed with pARKAN-I / rhG-CSF was grown in shaken flasks to evaluate the plasmid stability in complex (2YT and autoinduction) and chemically defined (HDF) media. Also, the influence of inducers (IPTG and lactose), the addition of glucose and the presence of antibiotics on the plasmid stability were evaluated. In order to obtain material for rhG-CSF purification, a batch culture with autoinduction medium without antibiotic and fed-batch culture HDF medium with antibiotic were performance in bioreactor at 30° C, 30% oxygen and pH 6.8. The purification steps included: lysis in high pressure continuous homogenizer, wash, solubilization and refolding of IB and cation exchange chromatography in SP-Sepharose. Three refolding methods were evaluated: diafiltration, dialysis and dilution. Plasmid stability was evaluated by the percentage of colonies on LB-agar plates with antibiotic in relation to the colonies that grew on LB-agar plates without antibiotics. Protein identity was determined by SDS-PAGE and Western Blotting. Relative purity and specific production of rhG-CSF were determined by densitometry of SDS-PAGE bands. Protein quantification was performed by the bicinchoninic acid method. In shaken flask cultures with 2YT medium without glucose, the growth was slower, but the exponential phase was longer, reaching higher cell concentration ($C_x=2.56\text{ g/L}$) than the cultures in 2YT medium with glucose ($C_x\approx 1.35\text{ g/L}$), which grew faster and reached the stationary phase earlier. Cultures with autoinduction medium provided similar growth to the 2YT medium without glucose. Cultures with HDF medium displayed slower growth and lower C_x (0.94 g/L). Shaken flask cultures with 2YT and autoinduction media showed 100% of kanamycin resistant colonies before and after induction, except for 2YT without antibiotic and without glucose, which presented 97.5% and 94.1% of kanamycin resistant colonies after 6 and 8 h of induction, respectively, despite being the medium with higher production of rhG-CSF. In flasks, HDF medium with antibiotic presented 93% of kanamycin resistant colonies before induction, decreasing to 85% after 4 h of induction, the rhG-CSF production was very low, and could be verified only by Western Blotting. Bioreactor cultivations showed low specific growth rate (0.30 h^{-1}), but high cell density and recombinant protein production. The rhG-CSF production was higher in autoinduction medium, which was cheaper than HDF. The dilution method using 20 mM tris buffer pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 and 10% glycerol showed the highest percentage of refolding. A purification process was established and allowed to obtain rhG-CSF with 87% purity, structural integrity and biological activity. The expression vector pARKAN-I, which is free of intellectual property and patent protection, showed high plasmid stability in the complex media evaluated in flask and bioreactor and allowed to produce rhG-CSF in large scale without addition of antibiotics to the culture medium, reducing the cost of the production process.

Keywords: rhG-CSF, plasmid stability, auto-induction medium, bioreactor cultivation, refolding, purification

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os neutrófilos são glóbulos brancos do sangue definidos como a primeira linha inata de defesa contra as bactérias, por isso precisam ser renovados continuamente no organismo. A proliferação destas células é principalmente controlada pelo Fator Estimulador de Colônia de Granulócito (G-CSF), molécula que controla a proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas. A neutropenia (adquirida ou congênita) é uma doença na qual ocorre diminuição dos neutrófilos no sangue a valores inferiores a $1.500/\text{mm}^3$. A neutropenia adquirida pode ser causada por quimioterapia, radioterapia ou pelo uso de medicamentos. A associação de neutropenia e infecções, conhecida como neutropenia febril, continua sendo a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer que recebem quimioterapia.

O G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) é um produto biotecnológico disponível no mercado mundial, sendo uma das proteínas recombinantes mais usadas com propósito clínico na neutropenia. O tratamento de pacientes com câncer e neutropenia febril inclui internação hospitalar para terapia com antibióticos e o uso do rhG-CSF reduz o tempo e os gastos com internação e antibiótico-terapia, por isso este medicamento encontra-se na lista de medicamentos excepcionais do Programa de Assistência Farmacêutica do Sistema Único de Saúde (SUS) (Welte *et al.* 1996; Hubel e Engert 2003).

A forma não glicosilada de rhG-CSF produzida em *Escherichia coli* com sequência de aminoácidos idêntica à humana recebeu o nome genérico de Filgrastim. No final de 2015, o Ministério da Saúde anunciou um acordo de transferência de tecnologia para que o biossimilar do Filgrastim desenvolvido pela Eurofarma com o nome de Fiprima fosse produzido pela Fiocruz. Atualmente, Filgrastim e biossimilares são comercializados no Brasil pelos laboratórios Biosintética/Aché (Filgrastim), Blau Farmacêutica (Filgrastine), Amgen (Granulokine), Teva (Tevagrastim), Dr Reddy's (Granomax) e Bergamo (Myograf). Entretanto, a matéria-prima desses produtos não é produzida no Brasil, de acordo com as bulas o rhG-CSF é importado, provavelmente a granel, formulado e distribuído pelos laboratórios citados. Filgrastim é produzido por BioSidus S.A., Argentina, Granulokine por F. Hoffmann-La Roche Ltd, Suíça, Tevagrastim por Lemery S.A., México, Granomax por Dr. Reddy's Laboratories Ltd, Índia, e Myograf por Xiamen Amoytop Biotech Co, China. A única exceção, além do Fiprima, parece ser o medicamento Filgrastine da Blau, porém como a empresa tem várias sucursais pelo mundo, não está claro em qual delas o produto é realmente fabricado. Dessa forma, apesar da existência dos produtos nacionais, os gastos do Brasil com a importação do

rhG-CSF seguem elevados, onerando o sistema de saúde, que distribui gratuitamente o Filgrastim.

A variante do rhG-CSF chamada Nartograstim, ainda não disponível no Brasil, tem cinco aminoácidos substituídos na região N-terminal, o que aumenta a atividade específica, estabilidade estrutural e a meia-vida da molécula. Ela foi clonada em *Escherichia coli* e produzida em frascos agitados no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan na forma de corpúsculos de inclusão (CI). Após purificar e renaturar os CI, o rhG-CSF purificado mostrou atividade biológica similar ao Granulokine (Gomes et al., 2012), porém o vetor utilizado para expressão do gene do rhG-CSF, plasmídeo pAE-6His, se mostrou instável para produção de proteínas recombinantes em cultivos de maior densidade celular (Silva et al., 2007). Para produzir uma proteína recombinante é necessário um plasmídeo estável, que permita alcançar elevada concentração da proteína de interesse, por essa razão o pAE-6His não é adequado para cultivos em biorreator. Portanto, foi construído o novo vetor de expressão, pARKAN-I, que contém uma sequência *par* para garantir a partição dos plasmídeos para as células filhas e portanto sua estabilidade (Li et al., 2005; Ptacin et al., 2010) e permitir assim a produção de proteínas recombinantes em cultivos de *E. coli* em biorreator.

Pelo papel primordial do rhG-CSF no tratamento da neutropenia e na prevenção das complicações clínicas do tratamento do câncer, além da redução dos gastos governamentais com o fornecimento gratuito desses medicamento, é de grande importância estabelecer um processo de produção nacional para obter rhG-CSF em larga escala. Além disso, a produção da variante Nartograstim visa oferecer uma alternativa terapêutica promissora ao Filgrastim, uma vez que suas características físico-químicas poderiam reduzir a dose e o tempo de tratamento da neutropenia febril. Para alcançar este propósito, além de um plasmídeo estável que garanta a síntese da proteína alvo, é necessário selecionar o meio de cultura e as condições de cultivo em biorreator, estabelecer um processo de purificação adequado e avaliar a atividade biológica da proteína purificada.

CONCLUSÕES

- O plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF foi altamente estável nos meios de cultura complexos avaliados, mesmo sem acréscimo de antibiótico, o que permite reduzir os custos de produção e obter o rhG-CSF com um vetor sem restrições de propriedade intelectual e proteção de patente.
- Em meio quimicamente definido, HDF, foi necessário acrescentar canamicina à cultura a fim de aumentar a retenção do plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF.
- O plasmídeo pARKAN-I/rhG-CSF foi mais estável em meio HDF quando se diminuiu a concentração do IPTG de 1,0 para 0,1 mM e a temperatura de 37 °C para 30 °C durante a indução.
- O glicerol usado como fonte de carbono nos cultivos com meio definido HDF levou a baixa formação de acetato, que não ultrapassou 0,4 g/L.
- A produção de rhG-CSF em biorreator com meio de autoindução em batelada mostrou-se economicamente mais vantajosa do que em HDF em batelada alimentada, pois no meio de autoindução o cultivo requer menos tempo, não é necessário acrescentar nem canamicina nem IPTG e a quantidade de glicerol empregada é menor.
- O rhG-CSF foi produzido satisfatoriamente em biorreator, sendo o meio de autoindução que permitiu maior estabilidade do plasmídeo e maior produção da proteína frente ao meio definido HDF em batelada alimentada.
- A renaturação por diluição direta em tampão tris 20 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, Triton X-100 a 0,1 %(m/v) e glicerol 10%(m/v) foi o método de maior percentagem de renaturação.
- O ajuste de pH do material renaturado em valores inferiores a 6,0 durante o processo de purificação do rhG-CSF propiciou a eliminação de impurezas no precipitado formado.

- O processo de purificação estabelecido permitiu obter o rhG-CSF com a estrutura secundária esperada e biologicamente ativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, PA., Berezin, EN., Mimica, MJ., 2014, Etiología das infecções em crianças com neutropenia febril pós-quimioterapia. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo, v.1, p. 40-42.
- Babaeipour, V., Khanchezar, S., Mofid, MR., Abbas, MPH, 2015, Efficient Process Development of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rh-GCSF) Production in *Escherichia coli* Iranian Biomedical Journal, v. 19 (2), p. 102-110.
- Baneyx, F., 1999, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Curr Opin Biotechnol, v. 10, p. 411-21.
- Bashir, S., Sadaf, S., Ahmad, S., Akhtar, MW., 2015, Enhanced and Secretory Expression of Human Granulocyte Colony Stimulating Factor by *Bacillus subtilis* SCK6: Biomed Res Int, v. 2015, p. 636249.
- Bashir, H., Ahmed, N., Khan, MA., Zafar, AU., Tahir, S., Khan, MI., Khan, F., Husnain, T., 2016, Simple procedure applying lactose induction and one-step purification for high-yield production of rhG-CSF: Biotechnol Appl Biochem, v. 63, p. 708-714.
- Baxter, JC., Funnell, BE., 2014, Plasmid partition mechanisms. Microbiol Spectrum 2:PLAS-0023-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0023-2014.
- Bellão, C., 2005, Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21 (DE3), Universidade de São Carlos, São Paulo.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer L, 2002, Biochemistry, 5th Edition: ISBN-10: 0-7167-3051-0 Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22512/>>
- Bishop, B., Koay, DC., Sartorelli, AC., Regan, L., 2001, Reengineering granulocyte colony-stimulating factor for enhanced stability: J Biol Chem, v. 276, p. 33465-70.
- Boneberg, EM., Hartung T., 2002, Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF: Inflamm Res, v. 51, p. 119-28.
- Brasil. Ministério da Saúde: homepage on the Internet. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude>. [2009 out 20]. Acesso em 18 de Junho de 2017
- Brasil. Ministério da Saúde, 2015, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/brasil_cria_medicamentos_contra_efeitos_colaterais_do_tratamento_de_cancer. Acesso em 18 de Junho de 2017
- Brasil. Ministério da Saúde. 2015 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Tratamento do câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; p., 122 2015. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao>>. Acesso em 18 de Junho de 2017

Brasil. Ministério da Saúde, 2017, Pertuzumabe para o tratamento do câncer de mama HER2-positivo metastático em primeira linha de tratamento associado ao trastuzumabe e docetaxel. Relatório de Recomendação Disponível em:<http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2017/Relatorio_PertuzumabeTrastuzumabe_CA_Mama_CP13_2017.pdf > Acesso em 18 de Junho de 2017

Brasil. Ministério da Saúde, 2016, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 122.

Brown, TA., 2003, Clonagem gênica e análise de DNA-uma introdução, Porto Alegre, Artmed.

Brooks AC., Hwang LC., 2017, Reconstitutions of plasmid partition systems and their mechanisms, Plasmid, v. 91, p. 37-41.

Campani, G., Silva, GG., Horta, ACL., Badino, AC., Giordano, RC., Gonçalves, VM., Zangirolami, TC., 2016, Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis, Chem Eng Process, v. 103, p. 63-69.

Carvalho, RJ., Cabrera-Crespo, J., Tanizaki, MM., Gonçalves VM., 2012, Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences: Appl Microbiol Biotechnol, v. 94, p. 683-94.

Champe, PC., Harvey, RA., Ferrier, DR., 2009, Bioquímica Ilustrada, Artmed. Porto Alegre, p. 520.

Chang, S., Chang, SY., Gray, O., 1987, Structural and genetic analyses of a par locus that regulates plasmid partition in *Bacillus subtilis*: J Bacteriol, v. 169, p. 3952-62.

Chen, J., Liu, Y., Wang, Y., Ding, H., Su, Z., 2008, Different effects of L-arginine on protein refolding: suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding: Biotechnol Prog, v. 24, p. 1365-72.

Choin, H. J., Keum, K., Lee, S.Y., 2006, Production of recombinant protein by high cell density culture of *Escherichia coli*, Chemical Engineering Science, v. 61, p. 876-885.

Clark, S. C., and Kamen, R., 1987, The human hematopoietic colony-stimulating factors: Science, v. 236, p. 1229-37.

da Silva, AJ., Horta, AC., Velez, AM., Iemma, MR., Sargo, CR., Giordano, RL., Novo, MT., Giordano, RC., Zangirolami, TC., 2013, Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in *E. coli* fed-batch cultures: Springerplus, v. 2, p. 322.

Dantas, N. S., Silva, R., 2006, Manual de Medicamentos Excepcionais: Brasília.

De Spiegeleer, P., Sermon, J., Lietaert, A., Aertsen, A., Michiels, CW., 2004, Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: J Appl Microbiol, v. 97, p. 124-33.

Dos Santos, M., 2012, Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção da proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante, Universidade de São Carlos.

Du, W., Song, Y., Liu, M., Yang, H., Zhang, Y., Fan, Y., Luo, X., Li, Z., Wang, N., He, H., Zhou, H., Ma, W., Zhang, T., 2016, Gene expression pattern analysis of a recombinant *Escherichia coli* strain possessing high growth and lycopene production capability when using fructose as carbon source: *Biotechnol Lett*, v.38, p.1571–1577.

Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P.I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z., Damborsky, J., 2015, Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway: *Microb Cell Fact*, v. 14, p. 201.

Eguia, FAP., Ramos, HR., Kraschowetz, S., Omote, D., Ramos CRR., Ho, PL., Carvalho, E., Gonçalves., 2018, A new vector for heterologous gene expression in *Escherichia coli* with increased stability in the absence of antibiotic: Plasmid (Submetido).

Einsfeldt, K., Severo Júnior, JB., Corrêa Argondizzo, AP., Medeiros, M.A., Alves, TL., Almeida, RV., Larentis, AL., 2011, Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability: *Vaccine*, v. 29, p. 7136-43.

Eiteman, MA., Altman, E., 2006, Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations: *Trends Biotechnol*, v. 24, p. 530-6.

Encarnação, A., Almeida, C., Brum, P., Karele, S., 2005, Projeto de uma planta para a produção de G-CSF recombinante [Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Química)]. Rio de Janeiro, Brasil: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Friebs, K., 2004, Plasmid copy number and plasmid stability: *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 86, p. 47-82.

Field, CM., Summers, DK., 2011, Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe, *J of Theoretical Biology*, v. 29, p.119-127.

Fiocruz, 2016, <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-inaugura-novo-centro-de-producao-de-insumos-para-o-sus>. Acesso em 09 de abril de 2018.

Fukunaga, R., Seto, Y., Mizushima, S., Nagata, S., 1990, Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 87, p. 8702-6.

García-Carbonero, R., Mayordomo, JI., Tornamira, MV., López-Brea, M., Rueda, A., Guillem, V., Arcediano, A., Yubero, A., Ribera, F., Gómez, C., Trés, A., Pérez-Gracia, JL., Lumberras, C., Hornedo, J., Cortés-Funes, H., Paz-Ares, L., 2001, Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial: *J Natl Cancer Inst*, v. 93, p. 31-8.

Gerdes, K., Molin, S., 1986, Partitioning of plasmid R1. Structural and functional analysis of the parA locus: J Mol Biol, v. 190, p. 269-79.

Gerdes, K., Müller-Jensen, J., Jensen, R.B., 2000, Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny, Molecular Microbiology, v. 3, p. 455-466.

Gerdes, K., Howard, M., Szardenings, F., 2010, Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation, Cell, v. 141, p. 927-942.

Gieseler, G., Pepelanova, I., Stuckenberg, L., Villain, L., Nölle, V., Odenthal, U., Beutel, S., Rinas, U., Scheper, T., 2017, Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography, Appl Microbiol Biotechnol, v.101, p.123-130.

Gombert, AK., and Kilikian, BV., 1998, Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer: J Biotechnol, v. 60, p. 47-54.

Gomes, FR., Maluenda, AC., Tápias, JO., Oliveira, FL., Sá-Rocha, LC., Carvalho, E., Ho, PL., 2012, Expression of recombinant human mutant granulocyte colony stimulating factor (Nartograstim) in *Escherichia coli*: World J Microbiol Biotechnol, v. 28, p. 2593-600.

Goyal, D., Sahni, G., Sahoo, DK., 2009, Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture, Bioresour Technol, v.100, p. 4468-4474.

Hägg, P., de Pohl JW., Abdulkarim, F., Isaksson, LA., 2004, A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*: J Biotechnol, v. 111, p. 17-30.

Hajinia, E., Fatemi, SS., Karkhane, AA., Akbar, A., Safekordi, AA., Yakhchali, B., 2012, Optimization of secretory expression of recombinant hGM-CSF in high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* using Taguchi statistical method Iranian Journal of Biotechnology, v. 10, No. 4, October 2012.

Holloway, CJ., 1994, Applications of recombinant DNA technology in the production of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor: Eur J Cancer, v. 30A Suppl 3, p. S2-6.

Horta, AC., Sargo, CR., da Silva, AJ., de Carvalho, GAM., Dos Santos, MP., Gonçalves, VM., Zangirolami, TC., de Campos, GR., 2012, Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control, Bioprocess Biosyst Eng, v. 35, p.1269-1280.

Hübel, K., Engert, A., 2003, Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary: Ann Hematol, v. 82, p. 207-13.

Jevsevar, S., Gaberc-Porekar, V., Fonda, I., Podobnik, B., Grdadolnik, J., Menart, V., 2005, Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted: Biotechnol Prog, v. 21, p. 632-9.

Johansson, L., Liden, G., 2006, A study of long-term effects on plasmid-containing *Escherichia coli* in carbon-limited chemostat using 2D-fluorescence spectrofluorometry, *Biotechnol Prog*, v. 22, p.1132-1139.

Kilikian, BV., Suarez ID., Liria, CW., Gombert, AK., 2000, Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction.: *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1019-1025.

Kim, CK., Lee, CH., Lee S-B., Oh, J-W., 2013, Simplified Large-Scale Refolding, Purification, and Characterization of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Escherichia coli*: *Plos One*, v. 8.

Kim,CK., Choi, JH., Lee, SB., Lee, SM., Oh, JW., 2014, Expression and Purification of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Fed-Batch Culture of *Escherichia coli* *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, p. 2425-2435.

Korz, DJ., Rinas , U., Hellmuth, K., Sanders, EA., Deckwer WD., 1995, Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*: *J Biotechnol*, v. 39, p. 59-65.

Kuga, T., Komatsu, Y., Yamasaki, M., Sekine, S., Miyaji, H., Nishi, T., Sato, M., Yokoo, Y., Asano, M., Okabe, M., 1989, Mutagenesis of human granulocyte colony stimulating factor, *Biochem Biophys Res Commun*, v. 1, p.103-111.

Larentis, AL., Argondizzo, AP., Esteves, GS., Jessouron, E., Galler, R., Medeiros, MA., 2011, Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumocoCxal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage: *Protein Expr Purif*, v. 78, p. 38-47.

Lawley, TD., Taylor, DE., 2003, Characterization of the double-partitioning modules of R27: correlating plasmid stability with plasmid localization: *J Bacteriol*, v. 185, p. 3060-3067.

Lee, SY., 1996, High cell-density culture of *Escherichia coli*: *Trends Biotechnol*, v. 14, p. 98-105.

Lehninger AL, 2006, *Lehninger- Princípios de Bioquímica* 4a Ed. Sarvier, p. 534-536.

Li, S., Feng , G., Bu, H., Li, Y., Zhang, J., Yang, Y., Lu , Y., 2002, Human peripheral blood monocyte derived dendritic cell culture and mature regulation: *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, v. 19, p. 268-72.

Li, Y., Dabrazhynetskaya , A., Youngren B., Austin, S., 2004, The role of Par proteins in the active segregation of the P1 plasmid: *Mol Microbiol*, v. 53, p. 93-102.

Lima, WJN., 2004, Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos de alta densidade celular, Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, 158 p.

Liu, T., Chen, JY., Zheng, Z., Wang, TH., Chen, GQ., 2005, Construction of highly efficient *E. coli* expression systems containing low oxygen induced promoter and partition region: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 68, p. 346-54.

Lu, H. S., Boone T. C., Souza L. M., Lai, P. H., 1989, Disulfide and secondary structures of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: Arch Biochem Biophys, v. 268, p. 81-92.

Lu, H. S., Clogston, C. L., Narhi, L. O., Merewether, L. A., Pearl, W. R., Boone, T. C., 1992, Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *Escherichia coli*. Characterization of the disulfide-reduced intermediates and cysteine-serine analogs: J Biol Chem, v. 267, p. 8770-8777.

Molineux, G., 2011, Granulocyte colony-stimulating factors: Cancer Treat Res, v. 157, p. 33-53.

Nascimento, TG., Andrade, M., Oliveira, RA., Almeida, AM., Gozzo, TO, 2014, Neutropenia: ocorrência e manejo em mulheres com câncer de mama em quimioterapia: Rev. Latino-Am. Enfermagem mar.-abr. v.22, p. 301-308.

Neidhardt, FC., Ingraham, JL., Schaechter, M., 1990, Physiology of the bacterial cell : A molecular approach: Sunderland, Mass., U.S.A., Sinauer Associates.
Novagen, 2006, pET System Manual. NOvagen- the GOLD standard for protein expression., 78 p.

Olaofe, OA., Burton, SG., Cowan, DA., Harrison, STL., 1995, Comparison of temperature - induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*: biochemical Engineering Journal, v. 52, p. 6.

Ow, D. S. W., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K.W., Yap, M.G.S., 2006, Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 alpha during batch fermentation: Enzyme Microb Technol, v. 39, p. 391–398.

Pathak, M., Dixit, S., Muthukumar, S., Rathore, A. S., 2016, Analytical characterization of in vitro refolding in the quality by design paradigm: Refolding of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: J Pharm Biomed Anal v. 126, p 124 -31.

Ptacin, J. L., Lee, S. F., Garner, E. C., Toro, E., Eckart, M., Comolli, L. R., Moerner, W. E., Shapiro, L., 2010, A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation: Nat Cell Biol, v. 12, p. 791-8.

Ramos, C. R., Abreu, P. A., Nascimento, A. L., Ho, P L., 2004, A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide: Braz J Med Biol Res, v. 37, p. 1103-9.

Riesenberg, D., Guthke, R., 1999, High-cell-density cultivation of microorganisms: Appl Microbiol Biotechnol, v. 51, p. 422-30.

Riesenberg, D., V. Schulz, W. A. Knorre, H. D. Pohl, D. Korz, E. A. Sanders, A. Ross, and W. D. Deckwer, 1991, High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate: J Biotechnol, v. 20, p. 17-27.

Rinas, U., 1996, Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*: Biotechnol Prog, v. 12, p. 196-200.

Rosano, GL., Ceccarelli, EA., 2014, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges: Front Microbiol, v. 5, p. 172.

Salje, J., Gayathri, P., Lowe, J., 2010, The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments, Nat. Rev. Microbiol, v. 8, p. 683–692.

Sargo, CR., 2011, Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de r *E.coli* utilizando glicerol como fonte de carbonoAperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de r *E.coli* utilizando glicerol como fonte de carbono, Universidade Federal de são Carlos, 83 p.

Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W, 2001, Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica, v. 2 Editora Edgard Blücher, São Paulo.

Scopes, R. K., 1994, Protein purification: Principles and Practice.

Seeger, A., Schneppe, B., M.C. Carthy, Deckwer, W. D, Rinas, U.,1995, Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*, Enzyme and Microbiological Technology, v. 10, p. 947-953.

Silva, M., 2005, Clonagem, expressão e purificação das proteínas de superfície PsaA e fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*, Programa de Interunidades em Biotecnologia ICB/IPT/Instituto Butantan Universidade de São Paulo, 149 p.

Silva, M., J. Cabrera-Crespo, M. E. Sbrogio-Almeida, E. N. Miyaji, P. L. Ho, L. C. Leite, and A. P. Lopes, 2007, Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* surface protein a, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1 and 3: Mol Biotechnol, v. 37, p. 146-54.

Silva, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2012a, Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*: Biotechnol Adv, v. 30, p. 691-708.

Silva, F., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., 2012b, Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology, Appl Microbiol Biotechnol, v. 93, p. 2571–2580.

Stieber, D., Gabant, P., Szpirer, C., 2008, The art of selective killing: plasmid toxin/antitoxin systems and their technological applications, BioTechniques, v. 45, p.344–346.

Studier, FW., 2005, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures: Protein Expr Purif, v. 41, p. 207-34.

Sørensen, HP., Mortensen, KK., 2005, Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*: Microb Cell Fact, v. 4, p. 1.

Tan, S., Wu, W., Liu J., Kong, Y., Pu, Y., Yuan, R., 2002, Efficient expression and secretion of recombinant hirudin III in *E. coli* using the L-asparaginase II signal sequence: Protein Expr Purif, v. 25, p. 430-436.

Tsai, W., Wu, T.C., Chiang, B. L., Wen, H. W., 2017, Cloning, expression, and purification of recombinant major mango allergen Man i 1 in *Escherichia coli*: Protein Expr Purif, v 130, p 35-43.

Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., Arakawa, T., 2004, Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification: Biotechnol Prog, v. 20, p. 1301-1308.

Vagenende, V., Yap, M. G., Trout, B. L., 2009, Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol: Biochemistry, v. 48, p. 11084-11096.

Vallejo, LF., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., Hoffmann, A., Gross, G., Weich, HA., Rinas, U., 2002, Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*: J Biotechnol, v. 94, p. 185-194.

Vanz, A. L., G. Renard, M. S. Palma, J. M. Chies, S. L. Dalmora, L. A. Basso, and D. S. Santos, 2008, Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization: Microb Cell Fact, v. 7, p. 13.

Vaz, M., 2008, Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinante (elF, LACK) para expressão de antígenos da *Leishmania chagasi*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Vélez, AM., da Silva, AJ., Horta, AC., Sargo, CR., Campani, G., Gonçalves, SG., de Lima CGR., Zangirolami, TC., 2014, High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations, BMC Biotechnol 14:6.

Vemula, S., Dedaniya, A., Bandaru, R., Mallu, MR., Settaluri VS., Ronda, SR., 2015a, Production of Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor in *Escherichia coli* Using Novel Media Supplements Through Integrated Statistical Optimization Designs: International Journal of Peptide Research and Therapeutics, v. 21, p. 299-312.

Vemula, S., Dedaniya, A., Thunuguntla, R., Mallu, MR., Parupudi, P., and Ronda, SR., 2015b, Simplified in vitro refolding and purification of recombinant human granulocyte colony stimulating factor using protein folding cation exchange chromatography: Journal of Chromatography A, v. 1379, p. 74-82.

Vemula, S., Thunuguntla, R., Dedaniya, A., Kokkiligadda, S., Palle, C., Ronda, SR., 2015c, Improved Production and Characterization of Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor from *E-coli* under Optimized Downstream Processes: Protein Expression and Purification, v. 108, p. 62-72.

Venkata, RD., Narasu, ML., Rao, AK., 2008a, A purification method for improving the process yield and quality of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expressed in *Escherichia coli* and its characterization: Biotechnol Appl Biochem, v. 50, p. 77-87.

Venkata, KD., Deepthi, A., Kali, SA., 2008b, Optimization of the downstream process for high recovery of rhG-CSF from inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*, Process Biochemistry, v. 43, p. 566-575.

Waegeman, H., and W. Soetaert, 2011, Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering: J Ind Microbiol Biotechnol, v. 38, p. 1891-910.

Wang, Z., Xiang, L., Shao, J., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G., 2006 Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism: Microb Cell Fact, v.5, p. 34-51.

Wang, CH., Wang, L., Geng, X., 2009, Optimization of refolding with simultaneous purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor from *Escherichia coli* by immobilized metal ion affinity chromatography, Biochemical Engineering Journal, v. 43, p.197-202.

Wang, C., Geng, X., 2012, Refolding and purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor using hydrophobic interaction chromatography at a large scale: Process Biochemistry, v. 47, p. 2262-2266.

Ward, O. P., 1991, Bioprocessing, New York: Van Nostrand Reinhold.

Weisbart, R. H., Golde, D. W., 1989, Physiology of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors in host defense: Hematol Oncol Clin North Am, v. 3, p. 401-9.

Welte, K., Gabrilove, J., Bronchud, M. H., Platzer, E., Morstyn, G., 1996, Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years: Blood, v. 88, p. 1907-29.

Wheatley, R W., Lo, S., Jancewicz, LJ., Dugdale, ML., Huber, RE., 2013, Structural Explanation for Allolactose (*lac*Operon Inducer) Synthesis by *lacZ* β -Galactosidase and the Evolutionary Relationship between Allolactose Synthesis and the *lac* Repressor: The Journal of Biological Chemistry, v. 288, p. 12993-13005.

Wheelwright, S. M., 1991, Protein purification: desing and scale up of downstream processing, Hanser publishers.

Williams, J.A., Luke, J., Johnson, L., Hodgson, C., 2006, pDNAVACCultra vector family: high throughput intracellular targeting DNA vaCxine plasmids, VaCxine, v. 24, p. 4671- 4676.

Wittman, B., Horan, J., Lyman, G. H., 2006, Prophylactic colony-stimulating factors in children receiving myelosuppressive chemotherapy: a meta-analysis of randomized controlled trials: Cancer Treat Rev, v. 32, p. 289-303.

Xiao, K., Yue, XH., Chen, WC., Zhou, XR., Wang, L., Xu, L., Huang, FH., Wan, X., 2018, Metabolic Engineering for Enhanced Medium Chain Omega Hydroxy Fatty Acid Production in *Escherichia coli*. , v. 9, p.139.

Xu, J., Li, W., Wu, J., Zhang, Y., Zhu, Z., Liu, J., 2006, Stability of plasmid and expression. Of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*, Appl Microbiol Biotechnol, v. 73, p. 780-788.

Xu, J., Banerjee, A., Pan, SH., Li, ZJ., 2012, Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using E. coli BL21 strains: Protein Expr Purif. v. 83(1), p. :30-36.

Yamamoto, A., A. Iwata, T. Saito, F. Watanabe, and S. Ueda, 2009, Expression and purification of canine granulocyte colony-stimulating factor (cG-CSF): Vet Immunol Immunopathol, v. 130, p. 221-5.

Yan, J., Zhao, SF., Mao, YF., Luo, YH, 2004, Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB. World Journal of Gastroenterology, v.10, p.1755–1758.

Yuriko, S., M. Glebson, O. Namide, and d. s. M. Elizabeth, 2015, Neutropenia febril de recorrência pós quimioterapia em pacientes com câncer de mama, Revista de enfermagem da UFPI.

Zhao, D., Liu, Y., Wang, X. Li, Wang, Q., Su, Z., 2014, Membrane combined with hydrophilic macromolecules enhances protein refolding at high concentration: Process Biochemistry, v. 49, p. 1129-1134.